黄粉甲抗冻蛋白 AFP84a 在大肠杆菌中的高效表达及活性检测

闫清华[1], 杨 理[2], 邵 强[3,*]
(1. 新乡医学院生命科学技术系, 河南新乡 453003; 2. 河南科技学院实验中心, 河南新乡 453003;
3. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为表达和纯化黄粉甲 *Tenebrio molitor* 抗冻蛋白, 采用 RT-PCR 方法扩增得到黄粉甲抗冻蛋白基因 *afp84a* cDNA, 将其连接到 pMAL-p2X 质粒上, 构建分泌型融合表达载体 pMAL-p2X-*afp84a*, 并在大肠杆菌 *Escherichia coli* TBI 中表达; 进一步利用 Amylose 柱亲和纯化出该重组蛋白, 后利用细菌抗寒性检测重组蛋白的生物活性。结果显示: 融合蛋白含量占总可溶蛋白的 40%。SDS-PAGE 分析表明, 用 $MgSO_4$ 处理法与超声波细胞破碎法均可使融合蛋白从细胞中释放; 融合蛋白经 Amylose 柱亲和纯化, Factor Xa 因子酶切, 电泳显示获得的目的蛋白呈单一条带。细菌抗寒性检测表明该重组蛋白具有较高的抗冻活性。黄粉甲抗冻蛋白基因 *afp84a* cDNA 的克隆、原核表达为进一步研究抗冻蛋白的性质和应用提供了有用的实验材料。

关键词: 黄粉甲; 大肠杆菌; 抗冻蛋白; 融合表达; 亲和纯化; 抗冻活性
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2010)11-1207-06

Highly efficient expression and activity detection of *Tenebrio molitor* antifreeze protein AFP84a in *Escherichia coli*

YAN Qing-Hua[1], YANG Li[2], SHAO Qiang[3,*] (1. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China; 2. The Experimental Center, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China; 3. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: For the expression and purification of *Tenebrio molitor* antifreeze proteins, RT-PCR method was adopted to obtain the cDNA of antifreeze protein gene *afp84a* which was then cloned into prokaryotic plasmid pMAL-p2X and expressed in *Escherichia coli* TBI strain. The recombination protein was purified through an amylose affinity column and assayed for antifreeze activity by observing bacterial survival rate in the presence of purified antifreeze protein following incubation for various intervals at 0℃. The results showed that the content of fusion protein was 40% of total dissolved proteins. SDS-PAGE analysis indicated that fusion protein could be released from cells treated with $MgSO_4$ or sonicate. A single band of target protein was acquired after the fusion protein was purified through amylose affinity column and incised by Factor Xa. Furthermore, the antifreeze protein AFP84a could increase the low temperature resistance of bacteria as shown in the biological activity analysis. The cloning and prokaryotic expression of *afp84a* from *T. molitor* could provide useful experimental materials for the further study of the nature and function of antifreeze protein AFP84a.

Key words: *Tenebrio molitor*; *Escherichia coli*; antifreeze protein; fusion expression; affinity purification; antifreeze activity

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)通过非共价吸附抑制机制吸附到冰核表面, 限制冰晶生长和抑制冰晶重结晶, 从而保护有机体免受结冰引起的伤害(Gilbert *et al*., 2004)。目前已经发现在鱼类、昆虫、植物、细菌和真菌中均有其存在(钟其旺和樊廷俊, 2002; 景晓红等, 2002)。近来, 昆虫抗冻蛋

基金项目: 河南省科技攻关项目(0224330110); 河南省动物学重点学科资助项目
作者简介: 闫清华, 女, 1980 年 1 月生, 河南许昌人, 硕士, 讲师, 主要从事生物化学及分子生物学研究, Tel.: 13782534459; E-mail: yqh3499@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shaoq99@sina.com
收稿日期 Received: 2010-04-09; 接受日期 Accepted: 2010-09-12

白的研究和应用引起了国内外专家的重视。Amir 等(2003)首次报道了在老鼠的心脏移植中，用抗冻蛋白低温保藏心脏从而成功地保护了心肌结构。2004 年，以色列示巴女王医学中心的研究人员利用抗冻蛋白对哺乳动物的心脏进行低温保存，不但延长保存时间，也使器官移植的成活率大大提高(Amir *et al*., 2004)。一系列研究证明，AFPs 在低温长期保存各种细胞、组织和器官，特别在器官移植中有很好的应用前景(徐振波等，2004；谢秀杰等，2005)。

目前，限制抗冻蛋白应用的主要问题就是抗冻蛋白还无法形成规模化生产。刘忠渊等(2005)对赤翅甲 *Dendroides canadensis* 抗冻蛋白基因成功地进行了原核表达，生物活性检测表明融合蛋白具有较强的抗冻性。本研究主要利用大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达黄粉甲 *Tenebrio molitor* 抗冻蛋白，通过优化组合，摸索出最佳的培养条件，并进一步纯化与检测该蛋白，为扩大生产规模及深入研究抗冻蛋白的性质和应用打下了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：大肠杆菌 JM109 和 TBI，质粒 pUCm-T 和 pMAL-p2X 均为本实验室保存。pMAL-p2X 为分泌融合表达载体含有载体蛋白麦芽糖结合蛋白(MBP)，可以利用 MBP 对麦芽糖的亲和性达到用 Amylose 柱对融合蛋白的亲和纯化。

1.1.2 酶及主要试剂：限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ，T_4 DNA 连接酶，DNA Ladder，IPTG，$AgNO_3$ 均购自 Sangon 公司；蛋白质 Marker，Amylose 亲和柱，Factor Xa 因子等均购自 NEB 公司；其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 PCR 引物的设计及目的基因的扩增

根据已知的黄粉甲抗冻蛋白基因序列(GenBank 登录号分别为 AF159116，AF159115，AF160494)设计一对 PCR 引物：

上游引物：5′-TCGAATTCCAATGCACTGGTGGTGCTGATTGTA-3′

下游引物：5′-GTGTCGAC**TTA**ATGTCCGGGACATCCTGTTG-3′

根据表达载体上的信息，在上游引物和下游引物分别加上 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ限制性内切酶酶切位点(由下划线标出)，终止密码子 TAA 的互补碱基 TTA 用黑体字表示。根据大肠杆菌对稀有密码子的偏好性，把上游引物中的 GGG 改为 GGT(用阴影标出)。

取 4℃冷处理 4 周的黄粉甲 10 头，按照 UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒说明书提取脂肪体总 RNA，以总 RNA 为模板进行 cDNA 第一条链的合成，然后以 cDNA 第一条链为模板进行 PCR 扩增。反应条件为：94℃预变性 10 min；94℃变性 60 s，59℃退火 60 s，72℃延伸 60 s，30 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保存。PCR 扩增后，吸取 10 μL 进行电泳(ω = 1.5% 琼脂糖)以检测扩增结果。

把扩增的片段回收后与克隆载体 pUCm-T 连接构建融合克隆载体 pUCm-T-*afp84a*，经 PCR(引物同上)、双酶切和测序(Sangon)等鉴定，得到目的片段。

1.3 原核表达载体 pMAL-p2X-*afp84a* 的构建

用限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切克隆重组质粒 pUCm-T-*afp84a*，得到目的片段与经同样双酶切的表达载体 pMAL-p2X 连接构建表达重组载体 pMAL-p2X-*afp84a*，转化大肠杆菌 TBI，筛选重组子，经过 PCR(引物同上)及双酶切等鉴定，保证目的片段的正确性。

1.4 融合蛋白的收获和纯化

1.4.1 从细胞周质中收获融合蛋白：以 1∶100 的比例接种 1.5 mL 含融合表达载体菌液于 150 mL 的高营养培养基中。37℃下震荡培养菌液至 OD_{600} = 0.6，加入 IPTG 至 0.5 mmol/L，25℃下震荡培养 6 h，4 000 × g 离心 20 min，收集细胞。依细胞重量用 30 mmol/L Tris-HCl 、20% 蔗糖、1 mmol/L EDTA 溶液(pH 8.0)重悬浮细胞，室温震荡培养 5 ~ 10 min。4℃ 8 000 × g 离心 20 min，用 15 mL 冰冷的 5 mmol/L $MgSO_4$ 重悬浮沉淀，在冰浴中震荡 10 min。4℃ 8 000 × g 离心 20 min，取适量上清液进行 SDS-PAGE(10% 的分离胶)鉴定分析。

1.4.2 用破碎细胞法收获融合蛋白：同 1.4.1 方法收集菌体细胞，加入 10 mL 过柱缓冲液悬浮菌体，在冰浴上进行超声波破碎细胞(脉冲为 15 s 或更短)，4℃ 12 000 × g 离心 30 min，收集上清液，SDS-PAGE(10% 的分离胶)鉴定分析。

1.4.3 融合蛋白的亲和纯化：按 Amylose 亲和柱说明书将 1.4.1 与 1.4.2 收集到的上清液加入到柱床内，进行亲和层析，收集 3 ~ 5 管样品洗脱液。通过紫外光吸收法测定并计算出各管洗脱蛋白的浓度；最后用 SDS-PAGE(10% 的分离胶)检测洗

脱样品。

1.4.4　Factor Xa 因子酶切融合蛋白：按 Factor Xa 因子说明说进行，反应结束后，SDS-PAGE(15%的分离胶)检测。

1.5　目的蛋白 AFP84a 的亲和纯化

按 1.4.4 方法将完全酶切融合蛋白后的反应液加入到柱床内，进行亲和层析，用 SDS-PAGE(15%的分离胶)检测洗脱样品，并用海波银染来显示胶板上的目的蛋白条带。海波银染法如下：电泳结束后取下凝胶，用双蒸水洗 3 遍，每次 30 s，轻摇；加入 0.02% $Na_2S_2O_3$ 适量，轻摇 1 min；用双蒸水洗 3 遍，每次 30 s，轻摇；加入 5 倍体积的染色液(0.2% $AgNO_3$，0.075% HCHO)，轻摇 15 min；用双蒸水洗 30 s，轻摇；加入 6 倍体积的显色液(6% Na_2CO_3，0.05% HCHO，0.004% $Na_2S_2O_3$)，轻摇 1 ~3 min；加入 6 倍体积的终止液(5% CH_3COOH)，观察。

1.6　AFP84a 的细菌抗寒性能检测

将新鲜培养的含质粒 pMAL-p2X 的菌液(OD_{600} =0.3 左右)稀释 100 万倍。吸取 300 μL 的菌液在氨苄青霉素的 LB 平板上涂 3 个板作为阳性对照，37℃倒置培养 12 h 后进行菌落总数测定。分别加入终浓度为 0，10，30，50，70 和 90 μg/mL 的 AFP84a(经过滤灭菌)，以不加 AFP84a 而只加入相同量透析缓冲液为阴性对照（每种浓度和阴性对照都为 3 个 Eppendorf 管），在 0 ~ 1℃ 分别处理 24，48，72，96，120 和 144 h。经处理后，立刻分别吸取 100 μL 菌液在氨苄青霉素的 LB 平板上进行涂板，37℃倒置培养 12 h，然后进行菌落记数(取平均值)。

2　结果与分析

2.1　黄粉甲抗冻蛋白基因 *afp84a* cDNA 的 RT-PCR 结果

以反转录后的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，电泳检测结果如图 1 所示。根据黄粉甲抗冻蛋白基因高度同源性等特征设计一对引物扩增出几条大小不同的片段，对比 Ladder 显示的分子量初步判断大小为 252 bp 左右的目的条带，在 200 ~300 bp 之间回收预期的目的条带。进一步测序得到了目的片段。目的片段 *afp84a* 保持了很高的序列一致性(95.86%)，尤其是与 GenBank 注册号为 AF159114 的序列对比相似性最高可达 99.71%。

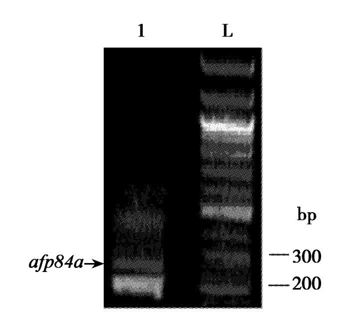


图 1　黄粉甲抗冻蛋白基因 *afp84a* cDNA 的 RT-PCR 产物电泳结果

Fig. 1　Agarose electrophoresis analysis of RT-PCR products of the cDNA of *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene *afp84a*

1：RT-PCR 产物 RT-PCR product；L：100 bp DNA Ladder.

2.2　细胞周质中融合蛋白 MBP-AFP84a 的纯化

从图 2 我们可以看出目的融合蛋白在上清液中含量较高，同时融合蛋白也存在 $MgSO_4$ 处理后的沉淀中，对上清液进行过柱洗脱，第 3 和第 4 管中目的融合蛋白含量较高，进一步通过波长为 280 和 260 nm 紫外吸收光检测及公式[$C(mg/mL) = 1.45OD_{280} - 0.74OD_{260}$]计算各管洗脱液的蛋白浓度，可知第 3 管洗脱液的蛋白浓度最大(0.575 mg/mL)，第 4 管次之(0.495 mg/mL)。进一步通过 Bandscan4.3 软件对电泳图进行分析，目的融合蛋白占总可溶蛋白的 36%。

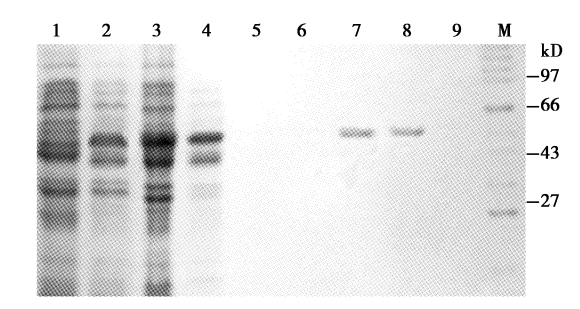


图 2　表达菌 TBI 细胞周质中融合蛋白 MBP-AFP84a 的纯化电泳图

Fig. 2　SDS-PAGE pattern of affinity chromatography of fusion protein MBP-AFP84a from the periplasm of expression strain TBI

1：未诱导菌全蛋白 Total proteins of bacteria；2：诱导菌全蛋白 Total proteins of induced bacteria；3：$MgSO_4$ 处理后沉淀 The precipitation after treatment with $MgSO_4$；4：$MgSO_4$ 处理后上清液 The supernatant after treatment with $MgSO_4$；5 –9：洗脱融合蛋白第 1，2，3，4，5 管 The eluted fusion proteins of the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th tube, respectively；M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker.

2.3　破碎细胞后融合蛋白 MBP-AFP84a 的纯化

破碎细胞后融合蛋白在沉淀中也有少部分存在，但主要存在于上清液中。对上清液进行洗脱后通过蛋白质的紫外吸收方法进行检测，可知第 3 和 4 两

管洗脱液蛋白含量较大，并且在图 3 中也得到了进一步验证。进一步通过 Bandscan4.3 软件对电泳图进行分析，目的融合蛋白占总可溶蛋白的 40%。

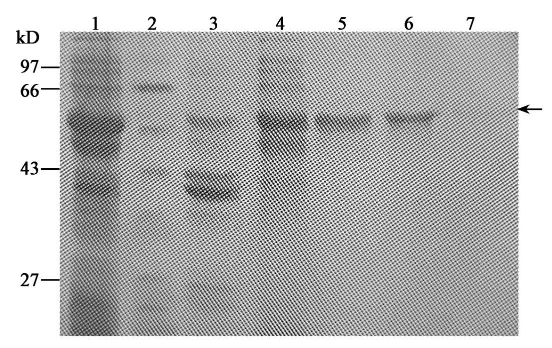


图 3 表达菌 TBI 细胞质中融合蛋白 MBP-AFP84a 的纯化电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE pattern of affinity chromatography of the fusion protein MBP-AFP84a from the cytoplasmic of expression strain TBI

1：诱导菌全蛋白 Total proteins of induced bacteria；2：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；3：破碎细胞后的沉淀 The deposition after sonicate；4：破碎细胞后的上清液 The supernatant after sonicate；5－7：第 3，4，5 管洗脱的融合蛋白 The eluted fusion proteins of the 3rd，4th and 5th tube，respectively；箭头示目的融合蛋白 The arrow indicates the target protein.

2.4 融合蛋白 MBP-AFP84a 纯化后的酶切

由图 4 可以看出，融合蛋白通过 Factor Xa 因子酶切后其位置明显的靠后，并且前端出现了分子量较小的蛋白，对照蛋白 Marker，分子量大小约为 8 kD，与预期的一致，是目的重组蛋白。

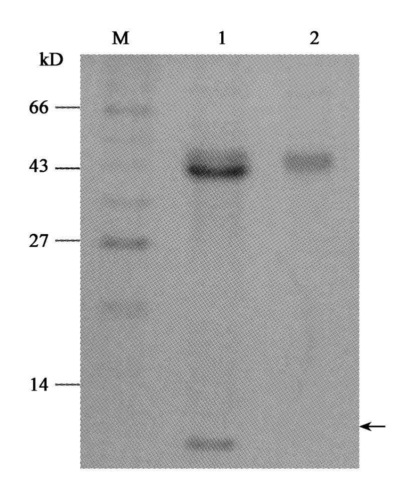


图 4 融合蛋白 MBP-AFP84a 酶切电泳银染图

Fig. 4 SDS-PAGE pattern of cleavage of the fusion protein MBP-AFP84a (stained with silver)

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：未切割完全的目的融合蛋白 Partially cleavaged fusion protein；2：洗脱的目的融合蛋白 Target fusion protein eluted；箭头示目的蛋白 AFP84a The arrow indicates the target protein AFP84a.

2.5 目的蛋白 AFP84a 的纯化

目的融合蛋白经 Factor Xa 因子酶切后，进行二次过柱纯化。用海波银染法进行检测，由图 5 可以看出二次过柱后洗脱纯化的抗冻蛋白 AFP84a 为单一电泳条带，且银染有很高的灵敏度，说明表达的抗冻蛋白 AFP84a 组分达到很高的纯度。

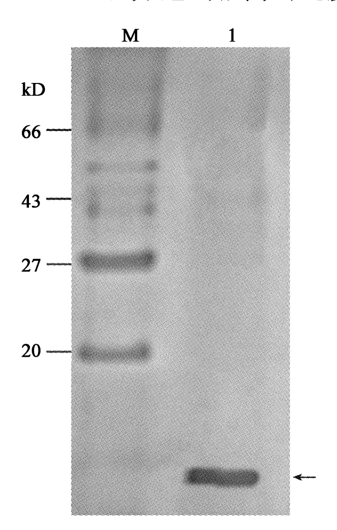


图 5 目的蛋白 AFP84a 电泳检测银染图

Fig. 5 SDS-PAGE pattern of cleavage of the target protein AFP84a

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：未切割完全的目的融合蛋白 Partially cleavaged fusion protein；2：洗脱的目的融合蛋白 Target fusion protein；箭头示目的蛋白 AFP84a The arrow indicates the target protein AFP84a.

2.6 AFP84a 的细菌抗寒性能检测

从图 6 可以看出：实验组与对照组具有明显的差别，抗冻蛋白具有一定的抗冻活性。实验组细菌在 0℃冷冻处理 72 h 后，存活的菌落数稍有上升，推测细菌在抗冻蛋白的保护下又进行了繁殖，对应于没加抗冻蛋白的对照组，0℃冷冻处理 24 h 后存

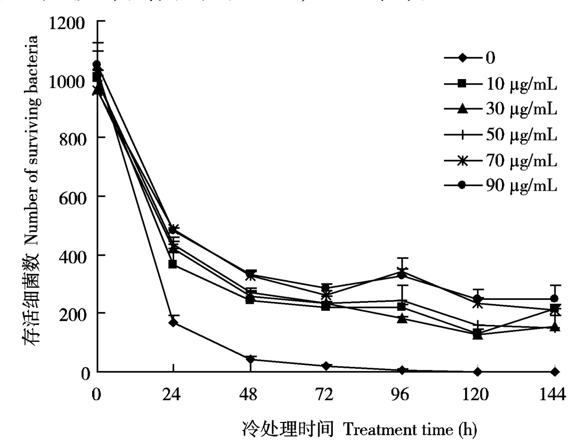


图 6 重组蛋白 AFP84a 细菌的抗寒性能

Fig. 6 Effects of recombination protein AFP84a on the low temperature resistance of bacteria

活细菌数明显减少，而 120 h 后未见有菌落出现；不同终浓度的抗冻蛋白之间的抗冻活性没有明显的差别。

3 讨论

黄粉甲抗冻蛋白的表达受时序和环境双重调控。末龄幼虫抗冻蛋白及其 mRNA 的含量都很丰富；同时，低温、缺水或饥饿等逆境都能诱导抗冻蛋白基因的转录和表达（Graham *et al.*, 2000）。通过对末龄幼虫 4 周的低温诱导，提取到了抗冻蛋白 mRNA 含量丰富的总 RNA，从而保证了反转录 PCR 的成功，进而为目的 cDNA 片段的克隆和表达奠定了基础。

由于融合蛋白易于纯化和进行检测，因而在大肠杆菌中表达外源蛋白时，最常用的方法是采用融合表达的方式。近年来，研究者们对于昆虫抗冻蛋白的表达是使融合蛋白表达多集中于细胞质中，而融合蛋白表达于细胞周质中的几乎未见报道。本研究采用分泌融合表达的方式，使目的基因片段克隆在分泌融合表达载体 pMAL-p2X 上，该载体 MBP 的信号肽可引导融合蛋白穿过胞质膜进入周质，周质是还原状态，有利于二硫键的形成，因此有利于富含二硫键的目的蛋白保持天然的活性，后续结果也印证了本研究成功地表达了具有活性的抗冻蛋白。

在进行目的蛋白纯化过程中，采用 $MgSO_4$ 溶解法与细胞破碎法均可使融合蛋白从细胞中释放，前者在最优的 $MgSO_4$ 浓度作用下，有一部分融合蛋白仍存在于沉淀中（图 2），沉淀中存在的融合蛋白，推测可能是在用 $MgSO_4$ 处理细胞时一部分融合蛋白没有溶出的缘故。当破碎细胞纯化目的蛋白时，沉淀中同样存在较少量的目的蛋白（图 3），推测沉淀中的少许融合蛋白与细胞碎片相结合，但上清液中目的蛋白的量（40%）较用 $MgSO_4$ 处理后上清中（36%）的量大。对比两种纯化途径来说，细胞破碎法获得的融合蛋白的量较大，而用 $MgSO_4$ 溶解法获得目的蛋白其过程简单，操作方便更有利于规模的扩大化和工业化应用。

分子量比较小的蛋白质在 SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝染色时，不能被酸或醇固定，还会从凝胶中洗脱下来。黄粉甲抗冻蛋白分子量比较小，结构比较特殊，可能还有不同程度的糖基化，利用 SDS-PAGE 检测目的蛋白时，用考马斯亮蓝染色很难得到黄粉甲抗冻蛋白的条带（资料未显示）。Liou 等（2000）在大肠杆菌中表达一种 84 个氨基酸的黄粉甲抗冻蛋白时，是通过检测目的蛋白的热滞活性来跟踪目的蛋白的。刘忠渊等（2005）在大肠杆菌中以融合蛋白形式表达赤翅甲抗冻蛋白获得成功，结果纯化得到具有一定生物活性的融合蛋白。通过反复实验，我们最终用银染方法检测到了单一的重组抗冻蛋白电泳条带，纯化出了理想的目的蛋白。

在检测细菌抗寒性实验时，首先检测目的蛋白的活性，实验组与对照组具有明显的差别（图 6），而不同终浓度抗冻蛋白之间的抗冻活性没有明显的差别，推测抗冻蛋白的抗冻活性可能是浓度非依赖性的，其确切原因有待于进一步研究。作为对比，我们又检测了融合蛋白的活性，实验组与对照组也具有明显的差异，显示融合蛋白同样具有细菌抗寒性能，这与刘忠渊等（2005）、赵干等（2005）的结果相一致，也暗示融合蛋白中融合的载体蛋白没有影响到目的蛋白的结构和功能。实验组中目的蛋白的浓度都是 10^{-6}级，印证了昆虫抗冻蛋白具有较强的抗冻活性。由于在该方法测定抗冻蛋白活性过程中存在很多影响因素，因而其结果存在一定的误差，而直接精确反映抗冻蛋白活性的热滞值有待于进一步测定。

参 考 文 献（References）

Amir G, Rubinsky B, Horowitz L, Miller L, Leor J, Kassif Y, Mishaly D, Smolinsky AK, Lavee J, 2004. Prolonged 24-hour subzero preservation of heterotopically transplanted rat hearts using antifreeze proteins derived from arctic fish. *Annals of Thoracic Surgery*, 77 (5): 1648 – 1655.

Amir G, Rubinsky B, Kassif Y, Horowitz L, Smolinsky AK, Lavee J, 2003. Preservation of myocyte structure and mitochondrial integrity in subzero cryopreservation of mammalian hearts for transplantation using antifreeze proteins – an electron microscopy study. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 24: 292 – 297.

Gilbert JA, Hill PJ, Dodd CER, Laybourn-Parry J, 2004. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, 150: 171 – 180.

Graham LA, Walker VK, Davies PL, 2000. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Eur. J. Biochem.*, 267(21): 6452 – 6458.

Jing XH, Hao SG, Kang L, 2002. Cold adaptation in insects: progress in antifreeze protein research. *Acta Entomologica Sinica*, 45(5): 679 – 683. [景晓红，郝树广，康乐，2002. 昆虫对低温的适应——抗冻蛋白研究进展. 昆虫学报，45(5)：679 – 683]

Liou YC, Daley ME, Graham LA, Kay CM, Walker VK, Sykes BD, Davies PL, 2000. Folding and structural characterization of highly

disulfide-bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria. *Protein Expr. Purif.*, 19(1): 148–157.

Liu ZY, Zhang FC, Wang Y, Lu GD, 2005. Expression of the antifreeze protein gene of a pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* in prokaryote and detection of the protein biological activity. *Acta Entomologica Sinica*, 48(2): 179–183. [刘忠渊, 张富春, 王芸, 吕国栋, 2005. 赤翅甲抗冻蛋白基因的原核表达及蛋白生物活性检测. 昆虫学报, 48(2): 179–183]

Xie XJ, Jia ZC, Wei Q, 2005. Antifreeze protein structure and antifreeze mechanism. *Chinese Journal of Cell Biology*, 27: 5–8. [谢秀杰, 贾宗超, 魏群, 2005. 抗冻蛋白结构与抗冻机制. 细胞生物学杂志, 27: 5–8]

Xu ZB, Li YM, Gong SW, Li LH, 2004. The selection of new cryoprotectants in super low-temperature cell preservation. *Refrigeration*, 23(4): 19–24. [徐振波, 李彦媚, 弓松伟, 李来好, 2004. 新型冷冻保存剂在细胞低温冻存中的选择. 制冷, 23(4): 19–24]

Zhao G, Ma J, Xue N, Yang CG, Zhuan FF, Zhang FC, 2005. Cloning of a cDNA encoding antifreeze protein in *Microdera punctipenis dzunarica* (Coleoptera: Tenebrionidae) and its activity assay. *Acta Entomologica Sinica*, 48(5): 667–673. [赵干, 马纪, 薛娜, 杨长庚, 专芳芳, 张福春, 2005. 新疆准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白基因的克隆和抗冻活性分析. 昆虫学报, 48(5): 667–673]

Zhong QW, Fan TJ, 2002. Advances in fish antifreeze protein research. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 34(2): 124–130. [钟其旺, 樊廷俊, 2002. 鱼类抗冻蛋白的研究进展. 生物化学与生物物理学报, 34(2): 124–130]

(责任编辑: 赵利辉)